

DERWENT-ACC-NO: 2002-558995

DERWENT-WEEK: 200260

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Identifying optimal primers for amplification, useful e.g. in medicine,
to generate many overlapping or adjacent fragments

INVENTOR-NAME: HUMMEL, O

PRIORITY-DATA: 2000DE-1062566 (December 15, 2000)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
DE 10062566 A1	June 20, 2002	N/A	006	C12Q 001/68

INT-CL (IPC): C12Q001/68

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 10062566A

BASIC-ABSTRACT: NOVELTY - Identifying primer sequences, and pairs, for
generating many adjacent or overlapping PCR (polymerase chain reaction)
fragments from a given DNA sequence (I), is new.

DETAILED DESCRIPTION - Identifying primer sequences, and pairs, for generating
many adjacent or overlapping PCR (polymerase chain reaction) fragments from a
given DNA sequence (I), is new. A list is first drawn up of fragments (II) of
(I) that, from their length, are potential primers. The values of
characteristic parameters (CP) for each (II) are determined, with at least one
CP being evaluated continuously. Value ranges for CP are determined and from
these parameters (II) are classified as optimal or unsuitable for use as
primers. The value ranges are separated by a transition region that can be
represented by a transition function, continuous and with a strongly monotonic
progression. Each CP value in this region is assigned a rating corresponding
to the size of the appropriate transition function. (II) that are unsuitable,
on the basis of one or more CP, are discarded and the other (II) are given a
combined score (CS) by weighted summation of the sizes evaluated above and
those having CS that meet predetermined criteria are selected. The selected
sequences are then stored, displayed and/or output as primers and arranged into
pairs.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) computer program for the novel process; and

(2) device for performing the novel process.

USE - The method is used to design primers for PCR, e.g. for use in biology, biotechnology, human or veterinary medicine, agriculture etc.

ADVANTAGE - The method allows automated discovery of optimal primer pairs. It provides a more objective and realistic evaluation than known methods and makes possible rational analysis of long DNA fragments in the form of overlapping sequences, with high analytical throughput, lower dropout rates and savings in materials, labor and time.



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 100 62 566 A 1

⑤1 Int. Cl. 7:
C 12 Q 1/68

②1 Aktenzeichen: 100 62 566.5
②2 Anmeldetag: 15. 12. 2000
④3 Offenlegungstag: 20. 6. 2002

DE 100 62 566 A 1

⑦1 Anmelder:
GenProfile AG, 13125 Berlin, DE

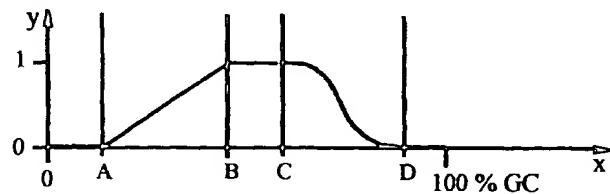
⑦4 Vertreter:
v. Bezold & Sozien, 80799 München

⑦2 Erfinder:
Hummel, Oliver, 13189 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Verfahren und Vorrichtung zur Ermittlung von Primer-Sequenzen

⑤7 Ein Verfahren zur Ermittlung von Primer-Sequenzen und Primer-Paaren zur Erzeugung einer Vielzahl benachbarter oder überlappender PCR-Fragmente für eine gegebene DNA-Sequenz umfasst die Schritte: Auflistung einer Vielzahl von Teilabschnitten der Sequenz, die aufgrund ihrer Länge als Primer ausgewählt werden können; Ermittlung der Werte von charakteristischen Parametern für jeden Teilabschnitt, wobei mindestens ein Parameter in Übergangsbereichen zwischen Parameterwertebereichen, für die der jeweilige Parameter als optimal oder als ungeeignet zur Erzeugung von PCR-Fragmenten gilt, mit einer stetigen und streng monotonen Übergangsfunktion kontinuierlich bewertet wird, wobei dem jeweiligen Parameterwert eine Bewertung entsprechend der Größe der zugehörigen Übergangsfunktion zugeordnet wird, Ausschluss von Teilabschnitten, die in Bezug auf mindestens einen Parameter als ungeeignet zur Erzeugung von PCR-Fragmenten bewertet werden, Gesamtbewertung der übrigen Teilabschnitte durch gewichtete Summenbildung der den Parameterwerten bei der kontinuierlichen Bewertung zugeordneten Größen; Auswahl der Teilabschnitte als Primer, die nach der Gesamtbewertung vorbestimmten Auswahlkriterien entsprechen; und Speicherung, Anzeige und/oder Ausgabe der ausgewählten Teilabschnitte als Primer-Sequenzen und Anordnung zu Primer-Paaren.



DE 100 62 566 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zur Ermittlung von Primer-Sequenzen, insbesondere Verfahren zur Primer-Auswahl für eine vorgegebene DNA-Sequenz auf der Grundlage einer kontinuierlichen Bewertung charakteristischer Primer-Parameter, Vorrichtungen zur Durchführung der Verfahren und deren Anwendungen.

[0002] Die Sequenzierung, d. h. die Ermittlung der Nukleotidabfolge in Nukleinsäure-Sequenzen, ist das fundamentale Verfahren zur Entschlüsselung des genetischen Codes. Neben der Aufklärung unbekannter Sequenzen dient die Sequenzierung u. a. dazu, individuelle Unterschiede in bekannten Sequenzen zu ermitteln. Zur Sequenzierung von langen DNA-Sequenzen ist es aus technischen Gründen erforderlich, die Sequenzen in handhabbare Unterabschnitte, die PCR-Fragmente, zu unterteilen. Diese Fragmente werden mittels Polymerase-Kettenreaktion mit hochspezifischen Oligonukleotiden, den sogenannten Primern, amplifiziert. Die Fragmente werden durch jeweils ein Primer-Paar begrenzt und bestimmt.

[0003] Für die Eigenschaften eines PCR-Fragments spielt die Auswahl des entsprechenden Primer-Paares eine wesentliche Rolle, insbesondere der Abstand der beiden Primer auf der zu amplifizierenden Sequenz, aus dem sich die Fragmentlänge ergibt. Außerdem müssen multiple Bindungsorte eines oder beider Primer auf der Sequenz berücksichtigt werden, um mögliche Nebenprodukte auszuschließen. Um mögliche Sequenzierungsfehler an den Enden der Fragmente zu eliminieren, können benachbarte Fragmente mit einer Mindestüberlappung von z. B. 100 Basen generiert werden. Primer stellen hochspezifische Reagenzien dar. Ihre Qualität hängt von einer Vielzahl von Parametern ab. Diese Parameter sind teilweise voneinander abhängig: z. B. Länge, Schmelztemperatur, GC-Gehalt, 3'-Pentamerstabilität, Häufigkeit des 3'-Heptamers und Fähigkeit zur Dimer- oder Hairpinbildung.

[0004] Es sind zahlreiche Computerprogramme bekannt, mit denen Primer in guter Qualität für einzelne PCR-Fragmente ausgewählt werden können: z. B. "Primer3" (S. Rozen et al. in "Methods Mol. Biol.", 2000, 132, 365-86) oder primer+ (GCG - Genetics Computer Group, (1998), Program Manual for the GCG Package, Version 10, 1998, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711). Diese Programme sind allerdings nicht für die effiziente Generierung überlappender PCR-Fragmente zur Sequenzierung sehr langer Genomabschnitte ausgelegt.

[0005] Bei dem von "Primer3" umgesetzten Verfahren wird eine Vielzahl von Teilabschnitten einer vorgegebenen Sequenz in Bezug auf eine Gruppe vorgegebener charakteristischer Primer-Parameter untersucht. Für jeden Parameter wird ein Wertebereich oder/und ein Optimalwert definiert, innerhalb dessen Teilabschnitte der DNA-Sequenz als Primer geeignet sind. Werte außerhalb des Bereichs/Optimalwerts werden mit einem Punktabzug bestraft. Die Auswahl einer größeren Anzahl von PCR-Primern ist wegen der diskontinuierlichen Bewertung, die einen zu strengen Filter darstellt, uneffektiv.

[0006] Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein neues Verfahren zur Ermittlung von Primer-Sequenzen anzugeben, mit dem die oben erläuterten Nachteile der herkömmlichen Verfahren überwunden werden und das eine automatisierte Auswahl von PCR-Primern ermöglicht. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, Vorrichtungen zur Umsetzung der Verfahren und Anwendungen der Verfahren bereitzustellen.

[0007] Diese Aufgaben werden mit Verfahren, Computerprogrammprodukten oder Vorrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1, 11 und 12 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

[0008] Die Grundidee der Erfindung ist es, die DNA-Sequenz auf der Grundlage einer kontinuierlichen Bewertung sowie einer gewichteten Gesamtbewertung der Primer-Parameter mit besten Primer-Paaren abzudecken. Als Parameter können neben den gebräuchlichen (s. o.) auch jeder weitere Parameter einbezogen werden. Das erfindungsgemäße Verfahren optimiert die Primerqualität für die automatisierte Sequenzierung durch kontinuierliche Bewertung und Wichtung aller betrachteten Parameter.

[0009] Die Erfindung besitzt den Vorteil, dass die Eignung eines Teilabschnitts als Primer objektiver bzw. realistischer bewertet wird als bei den herkömmlichen Techniken und dass die Analyse von langen DNA-Sequenzen in Form überlappender Sequenzabschnitte als Analyseseinheiten in rationeller Weise ermöglicht wird. Damit wird ein hoher Analyseerfolg bei einer geringen Ausfallquote erzielt, woraus sich eine Einsparung an Material, Arbeit und Zeit ergibt.

[0010] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Computerprogramm zur Umsetzung des genannten Verfahrens.

[0011] Gegenstand der Erfindung ist auch eine Vorrichtung zur Ermittlung von Primer-Sequenzen mit einer Einrichtung zur Erfassung einer Vielzahl von Teilabschnitten einer gegebenen Sequenz und zur Bewertung der charakteristischen Primer-Parameter, einer ersten Auswahlvorrichtung, die dazu ausgelegt ist, als Primer-Sequenzen ungeeignete Teilabschnitte der Sequenz zu verwerfen, einer zweiten Auswahlvorrichtung, die dazu ausgelegt ist, die Summe der gewichteten Einzelbewertungen der übrigen Teilabschnitte mit einem vorbestimmten Auswahlkriterium, z. B. einem Absolutschwelligwert und/oder einer Maximalwertbildung, zu vergleichen, und einer dritten Auswahlvorrichtung, die dazu ausgelegt ist, die besten Primer-Paare zu ermitteln. Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst auch Einrichtungen zur Speicherung, Ausgabe und/oder Anzeige der ermittelten Primer-Sequenzen und Primer-Paare.

[0012] Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt vorteilhafterweise zahlreiche Anwendungen in der Biologie, Biotechnologie, Human- und Veterinärmedizin, Agrarwirtschaft, Ökologie sowie alle anderen Gebieten, in denen die Sequenzierung von Nukleinsäuren eine Rolle spielt.

[0013] Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung des Verfahrensablaufes, der Erläuterung eines Beispiels und der beigefügten Zeichnung ersichtlich. Fig. 1 zeigt ein Beispiel für eine erfindungsgemäß verwendete kontinuierliche Übergangsfunktion zur Bewertung eines Primer-Parameters (x-Achse: Parameterwerte, y-Achse: Bewertung der Parameterwerte).

Einzelheiten des erfindungsgemäßen Verfahrens

[0014] Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass auf Basis einer beliebig langen, bekannten Sequenz (der Sequenz, die z. B. aus der EMBL (European Molecular Biology Laboratories)-Datenbank stammt) und anhand festge-

legter Parameter PCR-Primer automatisch mit einer kontinuierlichen Bewertung der Parameter ausgewählt werden. Dazu wird die Sequenz zunächst über ihre gesamte Länge oder ein entsprechendes Teilstück für alle möglichen Teilabschnitte auf dieser Länge in Bezug auf die interessierenden Primer-Parameter charakterisiert. Die charakteristischen Parameter umfassen bestimmte Eigenschaften des Primers (z. B. Primerlänge, GC-Gehalt, Primer-Schmelztemperatur usw.) und Parameter, die festgelegte Kriterien charakterisieren (z. B. 3'-Pentamerstabilität, Häufigkeit des 3'-Heptamers oder das Vorkommen von repetitiven Sequenzen ("repeats")).

[0015] In Abhängigkeit von anderen Faktoren, z. B. der Sequenziermethode, den verwendeten Reagenzien und der Länge des zu sequenzierenden DNA-Abschnitts werden die Fragmentlängen und der Mindestüberlappungsbereich der einzelnen Fragmente vorgegeben. Außerdem können Bereiche der zu sequenzierenden DNA "maskiert" werden, wenn aus diesen keine PCR-Primer ausgewählt werden sollen. Dies können Sequenzbereiche sein, die im Genom häufig vorkommen (sogenannte "repeats") oder bekannte Polymorphismen sowie andere für die Primer-Auswahl ungeeignete Orte (z. B. innerhalb eines Exons). Auf der Grundlage aller festgelegten Vorgaben werden die optimalen Primer ermittelt.

1. Charakterisierung der gesamten Sequenz

[0016] In einem ersten Schritt wird die komplette Sequenz hinsichtlich der einbezogenen Parameter für alle potentiellen Primerpositionen und -längen untersucht. Es werden u. a. repeat-Regionen, bekannte Polymorphismen sowie weitere für die Primer-Auswahl ungeeignete Sequenzbereiche maskiert. Für alle vorgegebenen Primerlängen werden in einem zweiten Schritt die Werte der einbezogenen Parameter bestimmt (z. B. GC-Gehalt, Schmelztemperatur, 3'-Pentamerstabilität u. a.). Anschließend wird jedem Parameter auf der Grundlage einer parameterspezifischen kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Übergangsfunktion eine Bewertung zwischen 0 und 1 zugeordnet.

[0017] Die Übergangsfunktionen können erfindungsgemäß einen zwischen 0 und 1 kontinuierlichen Werteverlauf besitzen. "1" und "0" können auch als "beste Eignung" bzw. "keine Eignung" als Primer hinsichtlich der konkreten Eigenschaft beschrieben werden. Ein Beispiel hierfür ist in Fig. 1 für den Primer-GC-Gehalt (Guanosin-Cytosin-Gehalt) illustriert. Für Werte oberhalb und unterhalb vorbestimmter oberer und unterer Grenzwerte A bzw. D erfolgt die Bewertung mit 0. Primer mit einem mit 0 bewerteten Parameter dürfen nicht ausgewählt werden. Innerhalb des durch die Grenzwerte A und D aufgespannten Intervalls sind zwei weitere Grenzwerte (B, C) vorgesehen. Im abgeschlossenen Intervall von B bis C erfolgt die Bewertung mit 1, d. h. der Parameter ist im Wertebereich von B bis C optimal geeignet. Das Optimum für einen jeden Parameter darf einen relativ großen Wertebereich umfassen. Das Optimum wird von Bereichen flankiert (Bereich zwischen A und B sowie zwischen C und D), in denen die Qualität des möglichen Primers für den betrachteten Parameter abfällt. In diesen Bereichen wird eine kontinuierliche Bewertung durch mindestens eine Übergangsfunktion gebildet. Dieser Abfall kann durch unterschiedlichste Funktionen, auch verschieden für unterschiedliche Parameter, charakterisiert werden.

[0018] Zur mathematischen Beschreibung der Bewertung eines Parameters in diesen beiden Bereichen eignen sich u. a. lineare Funktionen und Winkelfunktionen, wie in Fig. 1 dargestellt. Dadurch ist eine kontinuierliche Bewertung aller bzw. ausgewählter Parameter, die einen Primer charakterisieren, möglich. Im Gegensatz zu den bereits verfügbaren Verfahren zum Primer-Design erfolgt die Bewertung der Parameter nicht sprunghaft.

2. Gesamtbewertung

[0019] Anhand der so gewonnenen Einzelbewertungen aller Parameter eines Primers wird eine Gesamtbewertung durchgeführt. Ist ein einbezogener Parameter eines Primers mit 0 bewertet worden, so wird dieser Primer von der Auswahl ausgeschlossen. Für alle übrigen möglichen Primer erfolgt die Gesamtbewertung durch Summation der Bewertungen aller einbezogenen Parameter, wobei auch eine Wichtung jedes einzelnen Parameters frei gewählt werden kann. Zur Bestimmung der am besten geeigneten Primer-Paare wird neben der Gesamtbewertung der beiden einzelnen Primer zusätzlich eine gewichtete kontinuierliche Bewertung der Fragmentlänge (die aus den Positionen von Vorwärts- und Rückwärtsprimer auf der Sequenz resultiert) und der beiden Primer-Schmelztemperaturen vorgenommen. Dazu erfolgt eine kontinuierliche Bewertung der Schmelztemperatur-Differenz zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer.

[0020] Das Primer-Paar mit der höchsten Summe der gewichteten Bewertungen wird ausgewählt. Ausgangspunkte zur Auswahl von Primer-Paaren können neben dem 5'-Ende der Sequenz auch kritische, z. B. maskierte Bereiche sein.

Beispiel

1. Auswahl der charakteristischen Parameter und deren Übergangsfunktionen

[0021] Es sind Primer für die Sequenz mit der Accession Number "D26607" aus der EMBL-Datenbank ("<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/emblfetch?D26607>") zu ermitteln. Die Sequenz hat eine Länge von 23142 bp (Basenpaaren). Es sollen Primer für den Bereich zwischen dem Basenpaar 1 und 4000 exemplarisch ausgewählt werden. Die PCR-Fragmente sollen eine Länge von 1050 bp haben. Die Überlappung der Fragmente soll mindestens 100 bp betragen. Die Primer sollen eine Länge von 18 bis 27 Nukleotiden haben. Wenn keine Fragmente generiert werden können, deren Länge höchstens um 120 bp von der vorgegebenen Fragmentlänge abweicht, soll die vorgegebene Fragmentlänge um 350 bp erhöht bzw. verringert werden. Als charakteristische Parameter der Primer werden die folgenden einbezogen:

- Länge,
- GC-Gehalt,
- Schmelztemperatur,
- Anzahl des 3'-Heptamers in der Gesamtsequenz,
- Freie Energie des 3'-Pentamers,

- Maskierung,
- Zugehörigkeit zu einem Exon,
- Vorkommen des 3'-Heptamers innerhalb eines Bereiches von 10 kbp.

5 [0022] Die letzten drei Parameter können nur die Werte 0 oder 1 annehmen. Alle übrigen Parameter werden kontinuierlich bewertet. Primer, für die wenigstens ein Parameter mit 0 bewertet wurde, werden von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen.

[0023] Für die Bewertung der Parameterwerte zwischen den Punkten A und B sowie C und D werden zwei Funktionen ausgewählt (siehe Fig. 1):

- 10 - für den Bereich [A, B]:
Fkt. 1:

$$15 \quad y = \frac{1}{B-A} * x - \frac{A}{B-A}$$

Fkt. 2:

$$20 \quad y = 0,5 * \cos \left[\pi \left(\frac{1}{B-A} * x - \frac{A}{B-A} + 1 \right) \right] + 0,5$$

- für den Bereich [C, D]:
Fkt. 3:

$$25 \quad y = - \frac{1}{D-C} * x + \frac{D}{D-C}$$

30 Patentansprüche

1. Verfahren zur Ermittlung von Primer-Sequenzen und Primer-Paaren zur Erzeugung einer Vielzahl benachbarter oder überlappender PCR-Fragmente für eine gegebene DNA-Sequenz, mit den Schritten:

- 35 - Erstellung einer Liste mit einer Vielzahl von Teilabschnitten der gegebenen Sequenz, die aufgrund ihrer Länge als Primer ausgewählt werden können,
- Ermittlung der Werte von charakteristischen Parametern für jeden Teilabschnitt, wobei mindestens ein Parameter kontinuierlich bewertet wird, indem für den Parameter charakteristische Parameterwertebereiche erfasst werden, für die der jeweilige Parameter entweder als optimal oder als ungeeignet zur Erzeugung von PCR-Fragmenten gilt, und diese Parameterwertebereiche durch Übergangsbereiche getrennt werden, die durch Übergangsfunktionen repräsentiert werden, die stetig sind und einen streng monotonen Verlauf besitzen, wobei dem jeweiligen Parameterwert in den Übergangsbereichen eine Bewertung entsprechend der Größe der zugehörigen Übergangsfunktion zugeordnet wird,
- Ausschluss von Teilabschnitten, die in Bezug auf mindestens einen Parameter als ungeeignet zur Erzeugung von PCR-Fragmenten bewertet werden,
45 - Gesamtbewertung der übrigen Teilabschnitte durch gewichtete Summenbildung der den Parameterwerten bei der kontinuierlichen Bewertung zugeordneten Größen,
- Auswahl der Teilabschnitte als Primer, die nach der Gesamtbewertung vorbestimmten Auswahlkriterien entsprechen, und
- Speicherung, Anzeige und/oder Ausgabe der ausgewählten Teilabschnitte als Primer-Sequenzen und Anordnung zu Primer-Paaren.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem als Parameter die Position des Teilabschnittes auf der Sequenz, die Länge des Teilabschnittes, der GC-Gehalt, die Schmelztemperatur, die 3'-Oligomehrstabilität, die 3'-Oligomehrhäufigkeit und/oder die Markierung ungeeigneter Sequenzbereiche für den Teilabschnitt ermittelt werden.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem Teilabschnitte mit Längen von weniger als 12 und mehr als 35 Nukleotiden als ungeeignet und mit Längen von 20 bis 24 Nukleotiden als optimal bewertet werden.

4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, bei dem Teilabschnitte mit GC-Gehalten von weniger als 15% und mehr als 85% als ungeeignet und von 45% bis 55% als optimal bewertet werden.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, bei dem Teilabschnitte mit Schmelztemperaturen von weniger als 30°C und mehr als 90°C als ungeeignet und im Temperaturbereich von 50°C bis 55°C als optimal bewertet werden.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Übergangsfunktionen durch Winkelfunktionen, lineare Funktionen oder Überlagerungen aus diesen gebildet werden.

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Auswahl von Teilabschnitten als Primer in Bezug auf die Fragmentlänge derart erfolgt, dass bei einer vorbestimmten optimalen Länge von Teilabschnitten für einen zuerst ausgewählten Teilabschnitt auf dem einen Strang der Sequenz die Teilabschnitte auf dem anderen Strang als ungeeignet bewertet werden, wenn sie zu einer Fragmentlänge führen, die geringer als eine vorbestimmte Mindestlänge oder größer als eine vorbestimmte Maximallänge ist.

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Auswahl von Teilabschnitten als Primer derart erfolgt, dass für einen zuerst ausgewählten Teilabschnitt auf dem einen Strang der Sequenz die Teilabschnitte

auf dem anderen Strang als ungeeignet bewertet werden, wenn beide Teilabschnitte eine Schmelztemperaturdifferenz besitzen, die größer als 10°C ist, wobei die Teilabschnitte als optimal bewertet werden, wenn die Schmelztemperaturdifferenz kleiner als 0,5°C ist.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem in einem Sequenzbereich, für den ein Teilabschnitt als Primer auf dem einen Strang der Sequenz ausgewählt werden soll, die 15 Primer mit den höchsten Gesamtbewertungen der einzelnen Primer vorausgewählt werden und zu diesen entsprechend der vorbestimmten optimalen Fragmentlänge jeweils die besten zugehörigen Teilabschnitte auf dem gegenüberliegenden Strang ausgewählt werden, wobei aus den so gebildeten Paaren von Teilabschnitten das Paar mit der höchsten Gesamtbewertung, die sich aus der Bewertung der einzelnen Teilabschnitte, der Schmelztemperaturdifferenz der beteiligten Primer und der Fragmentlänge ergibt, ausgewählt wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, bei dem als zusätzlicher Parameter in einem vorgegebenen Bereich der Sequenz die Lage des Primers relativ zu einem benachbarten Fragment zur Bildung einer vorbestimmten Mindestüberlappung erfasst wird.

11. Computerprogrammprodukt, das zur Ermittlung von Primer-Sequenzen und Primer-Paaren nach einem Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche eingerichtet ist.

12. Vorrichtung zur Ermittlung von Primer-Sequenzen und Primer-Paaren, die zur Durchführung eines Verfahrens mit den Schritten gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche eingerichtet ist, mit:

- einer Einrichtung zur Erfassung einer Vielzahl von Teilabschnitten einer gegebenen DNA-Sequenz und von zugehörigen charakteristischen Parametern,
- einer Bewertungseinrichtung zur Bewertung der ermittelten Parameter,
- einer ersten Auswahlrichtung, die dazu ausgelegt ist, als Primer ungeeignete Teilabschnitte der Sequenz zu verwerfen,
- einer zweiten Auswahlrichtung, die dazu ausgelegt ist, die übrigen Teilabschnitte zu bewerten, und
- Einrichtungen zur Speicherung, Ausgabe und/oder Anzeige der ermittelten Primer-Sequenzen und Primer-Paaren.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

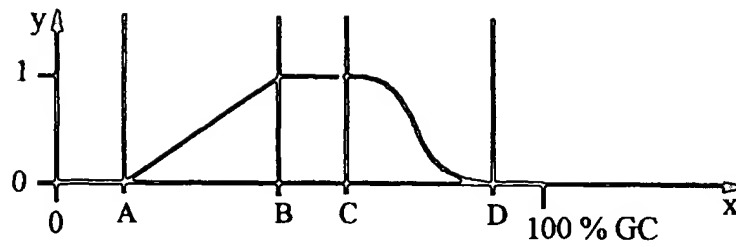


Fig. 1